Journal of Horticultural Science
https://jhs.um.ac.ir

Research Article
Vol. 38, No. 3, Fall 2024, p. 493-508

Symbiosis of Algal Endophytes *Aspergillus niger* and *Bacillus aquimaris* OD14 with Mexican Lime Seedlings under Salinity Stress Condition

L. Baghazadeh Daryaii[1], D. Samsampour[2*], A. Bagheri[3], J. Sohrabipour[3]

1 and 2- Ph.D. in Horticultural Science and Associate Professor, Agriculture and Natural Resources College, University of Hormozgan, Bandar Abbas, Iran, respectively.
(*- Corresponding Author Email: Samsampoor@hormozgan.ac.ir)
3- Assistant Professor, Plant Protection Research Department, Hormozgan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, Bandar Abbas, Iran

Dates	How to cite this article:
Received: 24-10-2021 Revised: 02-05-2024 Accepted: 12-05-2024 Available Online: 16-05-2024	Baghazadeh Daryaii, L., Samsampour, D., Bagheri, A., & Sohrabipour, J. (2024). Symbiosis of algal endophytes *Aspergillus niger* and *Bacillus aquimaris* OD14 with Mexican lime seedlings under salinity stress condition. *Journal of Horticultural Science*, *38*(3), 493-508. (In Persian with English abstract). https://doi.org/10.22067/jhs.2024.73232.1101

Introduction

Endophytes have symbiosis life within the plant tissues without causing any obvious negative effects. Seaweeds are one of the large and diverse groups of marine plants that play an essential role in marine and oceans ecosystems. Seaweeds show rich diversity of associated microorganisms in compare with the other multicellular organisms. Citrus species, are amongst the most important evergreen fruit trees, cultivated in many countries worldwide. There are several obstacles for citrus production in southern of Iran, limiting continuity of citrus production. Lack of suitable soil, salinity and drought stresses are the main challenges threatening citrus industry in southern of Iran. Similar to other citrus species, the production of Mexican lime is threatened by certain biological stresses (such as pests, plant diseases and weeds) and non-biological stresses (such as salinity, drought, floods, cold and heat stress). Endophytes are advantageous group of microorganisms that protect plants from biotic and abiotic stresses. One of the alternative ways to restore normal plant growth may be to use plant growth to stimulate endophytes. Endophytes can play an important role in plant growth. Endophytes from marine environment are gaining special interest because of their existence in the harsh conditions of marines and ocean ecosystem such as temperature, light availability, high salinity and osmotic stress. Endophytes have already been isolated from various marine habitat, including marine plants, marine invertebrates and vertebrates. Among these organisms, seaweeds are one of the most prevalent sources of marine-derived fungi and bacteria for chemical studies. The purpose of this study was the isolation of associated fungi and bacteria endophytes with seaweed species in Persian Gulf to investigate morphological and molecular characterization by using PCR amplifications ITS1-5.8S-ITS4 regions and 16s rRNA gene respectively. Here, we have evaluated the potential of inoculating Mexican lime seedlings with seaweeds fungi and bacteria endophyte combination, (*Aspergillus niger*+ *Bacillus aquimaris* OD14), to improve morphological, biochemical, antioxidant and photosynthesis pigments characterizes of Mexican lime in salinity condition.

Materials and Methods

The main aim of this study was to investigate the role of endophytic fungi (*Aspergillus niger*) and bacteria (*Bacillus aquimaris* OD14) in improving the growth of Mexican lime seedlings. The seaweed samples were collected from coastal regions of Bushehr province and Qeshm Island. Fungi and bacteria endophytes were isolated and identified base on morphological and molecular methods. Molecular characterization was investigated using PCR amplification of ITS1-5.8S-ITS4 regions and 16s rRNA gene respectively. Mexican lime seeds were sterilized with 0.5% sodium hypochlorite for 20 minutes and then completely distilled three times with distilled water.

https://doi.org/10.22067/jhs.2024.73232.1101

Seedlings pots containing autoclaved soil were placed in the greenhouse of the Faculty of Agriculture, Hormozgan University. The experiment was arranged as a factorial experiment based on randomized complete randomize design with three replications. Isolated fungi and bacteria by MT420720 and MT278260 accession numbers were used in eight months old Mexican lime seedlings. The suspension was adjusted to a concentration of $1×10^6$ cell per ml for fungi and $1×10^8$ cell per ml for bacteria inoculums. For better contact of seedlings with endophytes, inoculation was performed three times. After three months, salinity stress was applied. morphological (Leave, Stem and Root dry and fresh weight), biochemical (Protein, MDA and soluble sugars), antioxidant capacity (CAT, POD, SOD, APX and Gr activity) and photosynthesis pigments (Chlorophyll a, Chlorophyll b, Total Chlorophyll and Carotenoids) characteristics in treated Mexican lime seedlings and control were analyzed. Analysis of variance of traits was performed using SAS software version 9.4 and the means were compared using LSD method with a probability level of $P≤0.05$.

Results and Discussion

The results show that most characterizes were significant compare with control. For example, in 6000 µs/cm water salinity, leave fresh weight (203.49%), root fresh weight (347.41%), stem fresh weight (206.81%) and root dry weight (421.95%) were significantly higher compared with control (P>0.001). Endophytes inoculation can significantly improve photosynthesis pigments such as chlorophyll a (65.21%), chlorophyll b (11.9%), total chlorophyll (28.39%) and carotenoids (59.09%) (P>0.001) compare with control. In antioxidant capacity of seedling, CAT, POD, SOD, Gr and APX were analyzed, Endophytes can increase enzymes activity. For biochemical characterizes, in 6000 µs/cm water salinity, endophytes can significantly increase soluble sugars (17.85%) and decrease MDA (35.18%) in inoculated seedlings compare with control (P>0.001).

Conclusion

The results showed that the use of endophytic fungi and bacteria can increase the growth of Mexican lime seedlings under salinity stress. Thereby it can be used as an effective tool for growing salinity-sensitive plants in saline conditions.

Keywords: Abiotic stresses, Antioxidant capacity, Endophytic microorganisms, Glutathione reductase, Seaweeds

نشریه علوم باغبانی
https://jhs.um.ac.ir

مقاله پژوهشی
جلد ۳۸، شماره ۳، پاییز ۱٤۰۳، ص. ٤۹۳-۵۰۸

اثر همزیستی اندوفیت‌های *Aspergillus niger* و *Bacillus aquimaris* OD14 با دانهال‌های مکزیکن لایم تحت شرایط تنش شوری

لیلا بقازاده دریایی[1]- داود صمصام‌پور[2*]- عبدالنبی باقری[3]- جلوه سهرابی‌پور[3]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۸/۰۲
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۲/۲۳

چکیده

رشد و عملکرد گیاهان به‌سبب تنش‌های زنده و یا غیر زنده متعدد محدود می‌شود. در سال‌های اخیر، افزایش خشکی و خشکسالی در ایران روی کیفیت آب آبیاری تأثیرگذار بوده و آن‌را به سمت شور شدن سوق داده است. میکروارگانیسم‌های اندوفیت نقش مهمی در محافظت از گیاهان میزبان خود در برابر تنش‌های زیستی و غیرزیستی ایفا می‌کنند. در این مطالعه، از ترکیب اندوفیتی قارچی *Aspergillus niger* و باکتریایی OD14 *Bacillus aquimaris* همزیست با جلبک دریایی، به‌ترتیب در غلظت‌های 1×10^{6} سلول در یک میلی‌لیتر و 1×10^{8} سلول در یک میلی‌لیتر، به‌منظور ارتقاء تحمل دانهال‌های لیموترش رقم مکزیکن لایم نسبت به تنش شوری استفاده شد. اندوفیت قارچی و باکتریایی بر اساس مورفولوژیک و مولکولی (به‌ترتیب بر پایه تکثیر نواحی ITS1 و ITS4 و ژن 16s rRNA) با استفاده از تکنیک PCR مورد شناسایی قرار گرفتند. تلقیح در مرحله هشت ماهگی دانهال‌ها انجام و پس از گذشت سه ماه، تنش شوری صفر، ۲۰۰۰، ۴۰۰۰ و ۶۰۰۰ میکروزیمنس بر سانتی‌متر به‌صورت مرحله به مرحله اعمال شد. پس از هشت هفته، صفات مورفولوژیک، بیوشیمیایی، آنتی‌اکسیدانی و میزان رنگدانه‌های فتوسنتزی دانهال‌ها مورد ارزیابی قرار گرفتند. آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. نتایج نشان دادند، اکثر صفات مورد بررسی، اختلاف معنی‌داری نسبت به نمونه‌های شاهد داشتند. در شوری ۶۰۰۰ میکروزیمنس بر سانتی‌متر، اندوفیت باعث افزایش وزن تر و خشک ساقه (به‌ترتیب ۲۰۶/۸۱ و ۲۰۲/۳۸ درصد)، وزن تر و خشک برگ (به‌ترتیب ۲۰۳/۴۹ و ۸۷۰/۵۸ درصد) و وزن تر و خشک ریشه (به‌ترتیب ۳۴۷/۴۱ و ۴۲۱/۹۵ درصد) نسبت به شاهد شد. ترکیب اندوفیتی توانسته بود سطح رنگدانه‌های فتوسنتزی از جمله کلروفیل a (۶۵/۲۱ درصد)، کلروفیل b (۱۱/۹ درصد) و کاروتنوییدها (۵۹/۰۹ درصد) را به‌طور معنی‌داری نسبت به شاهد افزایش دهد. در بررسی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی دانهال‌ها در بالاترین سطح شوری، ترکیب اندوفیتی توانسته بود باعث روند افزایشی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت کاتالاز (۱۴۱/۸۴ درصد)، پراکسیداز (۶۶/۸ درصد)، سوپراکسید دیسموتاز (۶۰/۰۱ درصد)، گلوتاتیون ردوکتاز (۲۳۲/۴۱ درصد) و اسکوربیک پراکسیداز (۲۴/۸۸ درصد) نسبت به شاهد شود. همچنین، ترکیب اندوفیتی توانست باعث کاهش معنی‌دار مالون دی آلدئید (۳۵/۱۸ درصد) و افزایش قندهای محلول (۱۷/۸۵ درصد) و پروتئین کل (۲۲/۶۲ درصد) در دانهال‌های تلقیح شده نسبت به شاهد شود. به‌طور کلی، اندوفیت‌های قارچی و باکتریایی همزیست با ماکروجلبک‌ها می‌توانند به‌عنوان گزینه مناسب برای افزایش تحمل گیاهان نسبت به تنش‌های زیستی و غیر زیستی از جمله شوری مورد استفاده قرار گیرند.

واژه‌های کلیدی: تنش‌های غیرزیستی، جلبک‌های دریایی، ظرفیت آنتی اکسیدانی، گلوتاتیون ردوکتاز، میکروارگانیسم‌های اندوفیت

مقدمه

در بسیاری از مناطق دنیا، رشد و عملکرد گیاهان به سبب تنش‌های متعدد محدود می‌شود. گیاهان مجبور به تحمل و مقاومت در برابر شرایط نامساعد محیطی هستند که این امر خود باعث افزایش متابولیت‌ها و بهبود سیستم آنتی‌اکسیدانی آن‌ها می‌گردد (Khan *et al.*, 2017).

امروزه، شوری آب و خاک مورد استفاده در کشاورزی یکی از بزرگترین مسایلی است که بشر با آن روبروست. در بررسی‌ها بیان

۱ و ۲- به‌ترتیب دکتری و دانشیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران
(*- نویسنده مسئول: Email: Samsampoor@hormozgan.ac.ir)
۳- استادیار گروه تحقیقات گیاه‌پزشکی، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی هرمزگان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، بندرعباس، ایران
https://doi.org/10.22067/jhs.2024.73232.1101

شده است که ۱۲ میلیون هکتار از اراضی قابل کشت به‌دلیل شوری از بین رفته‌اند و این آمار رو به افزایش است (FAO, 2015). نیاز روز افزون به فرآورده‌های کشاورزی از یک سو و کمبود منابع آب مناسب در بیشتر نقاط کشور به‌ویژه در مناطق خشک از سوی دیگر، سبب شده، بهینه‌سازی مصرف آب در سر لوحه کار برنامه‌ریزان و سیاست-گزاران قرار گیرد.

گیاهان عموما به‌وسیله مکانیسم‌های دفاعی و تنظیم متابولیسم های سلولی، به تنش‌های محیطی عکس‌العمل نشان می‌دهند (Heidarvand & Amiri, 2010). این مکانیسم‌ها، سبب تغییرات مورفولوژیک، فیزیولوژیک، بیوشیمیایی می‌شود. در شرایط تنش، طی کاهش فتوسنتز و افزایش انرژی متابولیسمی در گیاه، اکسیدان‌هایی (ROS) از قبیل H_2O_2، O_2، O^{2+} و OH تولید می‌شوند. اکسیدان‌ها، در غلظت‌های پایین، نقش محرک‌های سیگنالی دارند، اما در غلظت های بالاتر، باعث صدمات اکسیداتیو و تأثیر بر لیپیدهای غشاء، نوکلئوتید اسیدها و پروتئین‌ها می‌شوند (Del Rio, 2015). تنش شوری با تأثیر بر تعادل جذب عناصر غذایی و افزایش فشار اسمزی منفی در سلول‌های گیاهی به‌شدت سلامت وعملکرد گیاه را تحت تأثیر قرارمی‌دهد (Yaish *et al.*, Yaish & Kumar, 2015 ;2015).

تاکنون، از روش‌های فیزیکی و شیمیایی متعددی برای کاهش اثرات مخرب تنش شوری و افزایش مقاومت گیاهان، مورد استفاده قرار گرفته است. استفاده از روش‌های سنتی و اصلاحی گیاهان اگرچه پیشرفت‌های چشمگیری داشته است، اما موفقیت اندکی در ایجاد تحمل شوری در گیاهان داشته‌اند (Munns &Tester, 2008 ; Joshi *et al.*, 2015 Dood & Perez-Alfocea, 2012; ;Krishna *et al.*, 2015).

یکی از منابع مهم درآمد در بسیاری از کشورهای دنیا، تولید و پرورش مرکبات می‌باشد. مرکبات نقش مؤثر و مهمی را در اقتصاد این کشورهای تولید کننده ایفا می‌کنند. تنش‌های محیطی از جمله شوری و خشکی، معزلی است که تولید مرکبات و به دنبال آن، بازارهای جهانی این محصول را تحت تأثیر قرار می‌دهند. در کشور ما نیز تولید مرکبات از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است و افراد بسیاری هستند که از تولید و فروش محصولات مرکبات امرار معاش می‌کنند. خشکی و شوری، از متداول‌ترین و در عین حال مهم‌ترین تنش‌های غیر زنده در رشد و پرورش گیاهان از جمله مرکبات می‌باشد. این تنش‌ها هر ساله خسارت قابل توجهی را در تولید و پرورش مرکبات در کشورهای مرکبات خیز از جمله ایران، وارد می‌آورند (Al-Yassin, 2005).

در مسیر کشاورزی پایدار، استفاده از میکروارگانیسم‌های اندوفیت به‌عنوان کودهای زیستی، باعث افزایش عملکرد و رشد گیاه می‌شوند و اثرات مخرب زیست‌محیطی را ندارند (Li, 2008)، علاوه‌براین، سلامت خاک بیشتر حفظ خواهد شد و روشی مقرون به‌صرفه می‌باشد (Pal *et al.*, 2015). اندوفیت‌ها می‌توانند با ایجاد همزیستی با گیاه میزبان، باعث افزایش رشد گیاه و افزایش تحمل گیاه نسبت به تنش-هاشوند (Saravanakumar & Samiyappan, 2007). این روش نسبت به روش‌های اصلاحی پیشین کم هزینه‌تر بوده و نتیجه کار زودتر آشکار می‌شود (Berg, 2009). اندوفیت‌های به‌دست آمده از محیط‌های دریایی، بدون این که به میزبان خود خسارتی وارد نمایند در بافت درونی میزبان خود زندگی می‌کنند و باعث تولید ترکیبات فعال زیستی می‌شوند که ارزش دارویی دارند (Strobel *et al.*, 2004 ; Strobel & Daisy, 2003).

ماکروجلبک‌های دریایی، به‌عنوان یک گروه گسترده از موجودات ماکروسکوپی شناخته می‌شوند که دارای ارزش غذایی بالایی مانند پروتئین‌ها، اسیدآمینه‌های ضروری (Mišurcová *et al.*, 2014 ; Volkmann *et al.*, 2008)، ویتامین‌ها، مواد معدنی می‌باشند و به دلیل دارا بودن ترکیبات زیست فعال، از آن‌ها برای تولید ترکیبات دارویی استفاده می‌شود (MacArtain *et al.*, 2007).

اندوفیت قارچی *A. niger* و باکتری‌های جنس *Bacillus* از مهم ترین و اصلی‌ترین جنس‌های استخراج شده از اکوسیستم‌های دریایی و ماکروجلبک‌ها می‌باشند. اکثر متابولیت‌های حاصل از اندوفیت‌های قارچی دریایی، از جنس *A. niger* بوده است. این جنس قارچ، تحمل بالایی نسبت به غلظت‌های مختلف کلرید سدیم موجود در محیط کشت حاوی نمک از خود نشان داده است (Peng *et al.*, 2016).

فلولینگ و همکاران (Flewelling *et al.*, 2015)، ۱۰۰ گونه جلبک را از کشورهای مختلف جمع‌آوری نمودند و قارچ‌های اندوفیت آن‌ها را مورد بررسی قرار دادند. تاثیر اندوفیت‌های قارچی و باکتریایی در افزایش تحمل گیاهان به تنش‌های زیستی و غیرزیستی به اثبات رسیده است. یاییش و همکاران (Yaish *et al.*, 2015)، اندوفیت‌های باکتریایی از ریشه درخت خرما جداسازی و شناسایی نمودند. بسیاری از این جدایه‌ها قادر به تولید آنزیم ACC دمیناز، آمونیوم، هورمون رشد گیاهی IAA توانایی کلاته کردن آهن و قابل جذب نمودن پتاسیم، روی و کلسیم بودند. اندوفیت قارچی *Paecilomyces formosus* LHL10، باعث افزایش طول شاخساره گیاه تلقیح شده تحت شرایط تنش شوری شد که این تغییرات می‌تواند در اثر تجمع پرولین، افزایش آنتی‌اکسیدانت‌ها، حفظ پتانسیل آب برگ گیاه و کاهش نشت یونی به‌دست آید (Khan *et al.*, 2012).

استان هرمزگان دارای استعداد ویژه‌ای برای پرورش مرکبات می باشد و بخش اعظمی از باغ‌های استان به کشت مرکبات اختصاص داده شده است. مرکبات و به‌ویژه لیموترش رقم مکزیکن لایم، گیاهان حساس به شوری می‌باشند. شوری باعث کاهش رشد و عملکرد مرکبات می‌شود (Ennab, 2016). با توجه به کمبود آب و شور شدن آب مزارع و باغات استان، پژوهش حاضر در زمینه جداسازی و شناسایی اندوفیت‌های همزیست با جلبک و استفاده از آن‌ها جهت افزایش تحمل به شوری در دانهال لیموترش رقم مکزیکن لایم انجام شد.

مواد و روش‌ها

برای انجام این پژوهش، آزمایشی به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در گلخانه دانشگاه هرمزگان به اجرا در آمد. تیمارها شامل دو عامل شوری و اندوفیت بودند. عامل شوری، شامل چهار سطح کلرید سدیم (صفر، ۲۰۰۰، ۴۰۰۰ و ۶۰۰۰ میکروزیمنس بر سانتی‌متر) و عامل اندوفیت، شامل ترکیب اندوفیت های قارچی و باکتریایی *Bacillus aquimaris* OD14 و *Aspergillus niger* بودند که به‌منظور ایجاد تحمل به تنش شوری در دانهال‌های لیموترش رقم مکزیکن لایم مورد استفاده قرار گرفتند. اندوفیت باکتریایی از جلبک *Rosenvingea orientalis* جمع‌آوری شده از جزیره قشم و اندوفیت قارچی از جلبک *Cladophoropsis* sp. جمع‌آوری شده از بوشهر استخراج شدند. قبل از تلقیح، جدایه‌ها در محیط‌های کشت PDA و NA حاوی غلظت‌های مختلف کلریدسدیم (۱، ۲ و ۳ مولار) کشت شدند و میزان تحمل به نمک در آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت. مایه‌زنی اندوفیت‌ها طی سه مرحله انجام شد. میزان تراکم سلولی باکتری‌ها 1×10^8 سلول در یک میلی‌لیتر محیط مایع و تراکم اسپورهای قارچی 1×10^6 سلول در یک میلی‌لیتر محیط مایع در نظر گرفته شد (Ali *et al*., 2017).

استخراج اندوفیت‌ها

نمونه‌های جلبک به‌خوبی با آب شهری شستشو داده شدند تا هر گونه آلودگی سطحی و اگزوفیت‌ها از آن‌ها جدا شود. نمونه‌ها برای ۵ ثانیه در الکل ۷۰ درصد غوطه‌ور و بلافاصله به‌مدت ۱۰ ثانیه در آب مقطر استریل قرار گرفتند. پس از خروج از آب مقطر استریل، روی کاغذ صافی استریل قرار داده شدند تا آب اضافی آن‌ها گرفته شود. سپس به‌وسیله اسکالپل استریل به قطعات ۰/۵ سانتی‌متری بریده و برای کشت مورد استفاده قرار گرفتند. برای استخراج اندوفیت‌های قارچی از محیط‌کشت PDA استفاده شد. برای استخراج اندوفیت‌های باکتریایی از محیط‌کشت NA استفاده شد. نمونه شاهد، از آب مقطر استریل که برای استریل نمودن نمونه استفاده شده بود، روی محیط کشت چکانده شد تا از روش استریل کردن نمونه‌های جلبک و نیز از استریل بودن محیط آزمایشگاه اطمینان حاصل شود. پتری‌دیش‌های کشت جلبک‌ها به‌خوبی با پارافیلم بسته و به‌مدت چهار هفته در انکوباتور با شرایط دمایی ۲۶ درجه سانتی‌گراد و ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی انکوبه شدند (Suryanarayanan *et al*., 2010).

تهیه بذر و آماده‌سازی دانهال‌ها

کشت بذور لیمو ترش رقم 'مکزیکن لایم' در تاریخ ۱۳۹۷/۶/۱۰ در گلخانه دانشگاه هرمزگان انجام شد. میوه‌های رسیده لیموترش رقم 'مکزیکن لایم' از باغ‌های لیموترش شهرستان رودان در شرق استان هرمزگان خریداری شدند. بذور میوه‌ها با قارچ کش بنومیل ۱/۵ در هزار ضدعفونی شدند. کشت بذور در سینی کشت در بستر کشت پیت ماس اتوکلاو شده انجام شد. از کودهای ۲۰:۲۰:۲۰ (N.P.K) هفته‌ای یک‌بار استفاده شد. سینی‌ها در شرایط نیمه سایه قرار داده و یک روز در میان آبیاری شدند. برای تهیه خاک گلدان‌ها، ماسه بادی، پیت ماس و کود پوسیده دامی به‌ترتیب به نسبت‌های ۲: ۲: ۱ با هم به‌خوبی مخلوط و به‌مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد اتوکلاو شدند. دانهال‌ها در مرحله چهار برگی به گلدان‌های اصلی منتقل شدند. آبیاری هفته‌ای سه بار انجام شد. گلدان‌ها در گلخانه نگهداری شدند تا دانهال‌ها به رشد مناسب برای تلقیح اندوفیت برسند. دانهال‌های هشت ماهه مکزیکن لایم به‌عنوان گیاه میزبان و حساس به شوری انتخاب شدند.

ظرفیت زراعی بستر کشت (SWG)

برای اندازه‌گیری ظرفیت زراعی، ابتدا گلدان‌ها کاملا آبیاری و سپس وزن تر آن‌ها اندازه‌گیری شد. گلدان‌ها به‌مدت سه روز در دمای ۷۵ درجه سانتی‌گراد درون دستگاه آون خشک و سپس توزین شد. برای محاسبه ظرفیت زراعی گلدان‌ها از فرمول زیر استفاده شد (Meggio *et al*., 2014).

$$SWG = \left[\frac{FW - DW}{DW}\right] \times 100$$

که در این معادله، FW وزن تر خاک و DW وزن خشک خاک می‌باشد. به‌منظور کاهش تنش و کاهش صدمات به گیاه، اعمال تنش شوری مرحله به مرحله انجام شد. در هفته اول به‌جز شاهد، همه گلدان‌ها با آب شور با هدایت الکتریکی ۲۰۰۰ میکروزیمنس بر سانتی متر آبیاری شدند. سپس در هفته دوم، شوری با هدایت الکتریکی ۴۰۰۰ میکروزیمنس بر سانتی‌متر نیز اضافه شد. در نهایت در هفته سوم، شوری با هدایت الکتریکی ۶۰۰۰ میکروزیمنس بر سانتی‌متر نیز اعمال شد.

شاخص‌های مورفولوژیک

پس از چهار هفته بعد از اعمال تنش شوری، نمونه‌برداری دانهال‌ها انجام گرفت. برای اندازه‌گیری‌های مورفولوژیک، صفاتی چون، وزن تر و خشک برگ، ساقه و ریشه، با استفاده از ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۰۰۱ گرم اندازه‌گیری شد. برای محاسبه وزن خشک، نمونه‌ها در دستگاه آون با ۸۰ درجه سانتی‌گراد تا زمان رسیدن به وزن ثابت قرار داده و سپس دوباره توزین شدند.

رنگدانه‌های فتوسنتزی

برای بررسی رنگدانه‌های برگ، ۰/۲ گرم برگ تازه گیاه با ۱۰ میلی‌لیتر استون ۸۰ درصد ساییده شد. محلول حاصل به فالکون ۱۵ میلی‌لیتری منتقل و به‌مدت ۱۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. محلول رویی با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر (مدل CECIL, CE2501, 2000 series ساخت کشور انگلستان) با سه طول موج ۴۷۰، ۶۴۵ و ۶۶۳ نانومتر خوانده شد.

اعداد به‌دست آمده در فرمول ذیل قرار داده شدند و میزان کلروفیل a، b و کل موجود در برگ محاسبه شد.

$Chl_a\ (mg\ g^{-1}) = [(12/7 \times A_{663}) - (2/6 \times A_{645})] \times$ ml acetone / mg leaf tissue

$Chl_b\ (mg\ g^{-1}) = [(22/9 \times A_{645}) - (4/68 \times A_{663})] \times$ ml acetone / mg leaf tissue

$(8.02 \times A_{663})] \times$ ml $+ Chl_T\ (mg\ g\text{-}1) = [(20.2 \times A_{645})$ acetone / mg leaf tissue

برای محاسبه میزان کاروتنوئیدهای برگ از فرمول زیراستفاده شد (Arnon, 1949).

$C_{x+c} = 1000A_{470} - 1.90Chl_a - 63/14Chl_b / 214$, (x = xanthophylls and carotenes)

صفات بیوشیمیایی

محتوی نسبی آب برگ

برای اندازه‌گیری محتوی نسبی آب برگ، ابتدا برگ‌ها با آب مقطر شستشو داده و سپس پنج دیسک هم اندازه از آن‌ها تهیه شد. دیسک‌ها توزین و به درون فالکون‌های ۱۵ میلی‌لیتری حاوی ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر ریخته و به‌مدت چهار ساعت در دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. دیسک‌ها آبگیری و توزین شده و به‌مدت ۲۴ ساعت در دستگاه اون با دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد خشک شدند. دیسک‌های خشک شده دوباره با استفاده از ترازوی حساس توزین شدند. درنهایت، سه وزن حاصل برای محاسبه محتوی نسبی آب برگ نمونه‌ها با استفاده از فرمول زیر مورد استفاده قرار گرفتند (Morgan, 1984).

$$\text{محتوی نسبی آب} = \frac{(\text{وزن تازه} - \text{وزن خشک})}{(\text{وزن آبگیری} - \text{وزن خشک})} \times 100$$

پروتئین کل برگ

برای اندازه‌گیری میزان پروتئین کل برگ، ابتدا مقدار ۰/۲ گرم از برگ در ۲ میلی‌لیتر بافر استخراج به‌خوبی ساییده شد. ترکیب به‌دست آمده به تیوپ‌های دو میلی‌لیتری منتقل و به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. برای تهیه معرف برادفورد، ۱۰۰ میلی‌گرم کومایسین بلو G250 (۰/۱ گرم)، در ۵۰ میلی‌لیتر اتانول ۹۵ درصد حل شد. پس از خنک شدن محلول، ۱۰۰ میلی‌لیتر فسفریک اسید ۸۵ درصد به‌تدریج به محلول اضافه و سپس با آب مقطر حجم محلول به یک لیتر رسانده شد. درون یک فالکون ۱۰ میلی‌لیتری، ۵ میلی‌لیتر معرف برادفورد ریخته شد و ۱۰۰ میکرولیتر عصاره پروتئینی به آن اضافه شد. بعد از ۲۰ دقیقه، یک میلی‌لیتر از محلول واکنش در طول موج ۵۹۵ نانومتر خوانده شد (Bradford, 1979).

قند کل محلول

برای سنجش قندهای کل محلول، از ۱۰۰ میلی‌گرم (۰/۱ گرم) برگ خشک شده استفاده شد. برگ‌های توزین شده درون فالکون‌های ۱۵ میلی‌لیتری ریخته شدند و به آن‌ها ۱۰ میلی‌لیتر اتانول ۷۰ درصد اضافه و به‌مدت یک هفته در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. بعد از گذشت یک هفته، ۰/۵ میلی‌لیتر از مایع رویی آن‌ها درون فالکون دیگر ریخته و با آب مقطر به حجم ۲ میلی‌لیتر رسانده و یک میلی‌لیتر فنول ۵ درصد به آن اضافه شد. سپس ۵ میلی‌لیتر سولفوریک اسید غلیظ به مواد درون فالکون اضافه شد. پس از ۳۰ دقیقه ترکیب حاصل در طول موج ۴۸۵ نانومتر با دستگاه اسپکتوفتومتر خوانده شد (Kochert, 1978).

مالون دی آلدئید

برای سنجش مالون‌دی‌آلدئید، از دو ماده TCA (تری کلرو استیک اسید) و TBA (تیو باربیوتیک اسید) به‌عنوان دو ماده اصلی واکنش استفاده شد. ۰/۲ گرم از برگ فریز شده در چهار میلی‌لیتر از محلول ۰/۱ درصد TCA به‌خوبی ساییده شد. مخلوط حاصل به فالکون‌های ۱۵ میلی‌لیتری منتقل و به‌مدت ۱۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. برای انجام واکنش، ابتدا دو محلول TCA ۲۰ درصد و TBA ۰/۵ درصد آماده شدند. دو میلی‌لیتر از آن به‌همراه دو میلی‌لیتر از محلول TCA ۲۰ درصد به‌درون یک فالکون ۱۵ میلی‌لیتری ریخته شد، سپس یک میلی‌لیتر از عصاره آماده شده در مرحله قبل به این دو محلول اضافه و به حمام بن ماری با دمای ۹۵

درجه سانتی‌گراد منتقل و به‌مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شد. سپس سریعا در حمام آب سرد خنک شدند. فاز رویی در طول موج ۵۳۲ خوانش شد. برای محاسبه غلظت MDA از ضریب خاموشی معادل (ضریب شکست MDA معادل $155 \frac{1}{mM\ cm}$ است) استفاده شد (Hodges *et al*., 1999).

ظرفیت آنتی‌اکسیدانی

برای تهیه عصاره آنزیمی، به ۰/۲ گرم از برگ‌های فریز شده، یک میلی‌لیتر از بافر استخراج سرد اضافه و به‌خوبی ساییده شد. تیوپ‌های دو میلی‌لیتری حاوی عصاره، به‌مدت ۲۰ دقیقه در دمای چهار درجه سانتی‌گراد با ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. رونشین که حاوی عصاره آنزیمی بود به تیوپ جدید منتقل شد و برای خوانش آنزیم‌ها مورد استفاده قرار گرفت.

فعالیت آنزیم پراکسیداز (POD EC 1. 11. 1.7)

برای سنجش میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز، یک میلی‌لیتر از محلول بافر فسفات با ۳۳ میکرولیتر عصاره آنزیمی مخلوط و در فواصل ۱۰ ثانیه به‌مدت یک دقیقه در طول موج ۴۷۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد (Chance & Maehly, 1955).

فعالیت آنزیم آسکوربیک پراکسیداز (APX EC 1. 11. 1. 11)

جهت خوانش فعالیت آنزیم آسکوربیک پراکسیداز، ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی به یک میلی‌لیتر محلول اندازه‌گیری اسکوربات اضافه و پس از یک دقیقه زمان، میزان جذب واکنش انجام شده در طول موج ۲۹۰ نانومتر خوانده شد. هر واحد آنزیمی مساوی با تجزیه یک میلی مولار اسکوربیک در هر دقیقه می‌باشد (Nakano & Asada, 1981).

فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD, EC 1.15.1.1)

میزان فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز با کمک مهار احیای نوری نیتروبلوتترازولیوم (NBT)، در طول موج ۵۶۰ نانومتر انجام شد.

بافر (۱): ال–متیونین ۱۳ میلی‌مولار و NBT ۷۵ میلی‌مولار تهیه شد.

بافر (۲): به ۲۰ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم، ۰/۰۰۱ گرم ریبوفلاوین افزوده شد (۴ میکرومولار).

دو میلی‌لیتر از محلول واکنش با ۵۰ میکرولیتر از عصاره آنزیمی مخلوط شد. محلول به‌مدت ۸ دقیقه در شرایط روشنایی لامپ ۴۰ وات قرار داده شد. سپس در طول موج ۵۴۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر خوانده شد. همچنین برای سنجش فعالیت آنزیم از نمونه شاهد روشنایی نیز استفاده شد. در نمونه شاهد، به‌دلیل عدم وجود آنزیم گیاهی، احیای کامل نیتروبلوتترازولیوم انجام خواهد گرفت و به فورمازون تبدیل می‌شود. اختلاف جذب نمونه‌ها و شاهد روشنایی برای محاسبه فعالیت آنزیمی استفاده شد (Becana *et al*., 1986).

فعالیت آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز (GR, EC 1.6.4.2)

به‌منظور سنجش فعالیت آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز، ابتدا بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار، DTNB ۰/۷۵ میلی‌مولار، NADPH ۰/۱ میلی‌مولار و GSSG یک میلی‌مولار تهیه شد. برای ایجاد مخلوط واکنش، ۲۵۰ میکرولیتر از محلول DNTB، ۵۰ میکرولیتر از محلول NADPH، ۵۰ میکرولیتر محلول GSSG، ۵۰۰ میکرولیتر بافر فسفات و ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی استفاده شد. GSSG در آخر به مخلوط واکنش اضافه شد. پس از اضافه کردن این ماده، جذب واکنش بعد از سه دقیقه در طول موج ۴۱۲ نانومتر خوانده شد. برای حل شدن ماده DTNB از مگنت و هیتر با دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد استفاده شد. ضریب شکست TNB ($14/15 \frac{1}{M\ cm}$) است که برای محاسبه فعالیت گلوتاتیون ردوکتاز، از میلی‌مول TNB در دقیقه در گرم وزن تازه برگ بیان می‌شود (Smith *et al*., 1988).

سنجش میزان فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT EC 1. 11. 1.6)

برای سنجش میزان فعالیت آنزیم کاتالاز، ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی به یک میلی‌لیتر محلول سنجش اضافه و میزان فعالیت آنزیمی آن در زمان‌های صفر و هر ۲۰ ثانیه تا رسیدن به ۶۰ ثانیه (صفر، ۲۰، ۴۰ و ۶۰ ثانیه)، در طول موج ۲۴۰ نانومتر خوانده شد. هر واحد آنزیمی کاتالاز برابر است با تجزیه یک مولار پراکسید هیدروژن در هر دقیقه، ضریب خاموشی در این واکنش ۴۰ $mM.cm^{-1}$ می‌باشد (Dhindsa *et al*., 1981).

تجزیه و تحلیل آماری

تیمار دانهال‌های لیموترش رقم مکزیکن لایم با اندوفیت و تنش شوری آب، با استفاده از آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی با سه تکرار انجام شد. داده‌های حاصل از تحقیق با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS آنالیز شدند. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون LSD در سطح ($P \leq 0.05$) مورد بررسی قرار گرفتند.

نتایج و بحث

صفات رشدی گیاه

اختلاف معنی‌داری بین سطوح مختلف تیمار شوری و اثر متقابل شوری و اندوفیت بر صفات وزن تر و خشک ساقه، برگ و ریشه در سطح ۰/۱ و ۱ درصد مشاهده شد (جدول ۱). با این حال، در اثر متقابل شوری و اندوفیت، بر وزن خشک ریشه و نسبت وزن تر به وزن خشک ساقه، تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. نتایج نشان دادند، در نمونه‌های شاهد، با افزایش درجات شوری، مقادیر وزن تر و خشک اندام‌ها کاهش پیدا کرده است. این در حالی بود که، در شوری ۶۰۰۰ میکروزیمنس بر سانتی‌متر، اندوفیت باعث افزایش وزن تر و خشک ساقه (به‌ترتیب ۲۰۶/۸۱ و ۲۰۲/۳۸ درصد)، وزن تر و خشک برگ (به‌ترتیب ۲۰۳/۴۹ و ۸۷۰/۵۸ درصد) و وزن تر و خشک ریشه (به‌ترتیب ۳۴۷/۴۱ و ۴۲۱/۹۵) نسبت به نمونه شاهد شد (جدول ۲). در دانهال‌های تلقیح شده، حتی در سطوح شوری بالاتر، افزایش معنی‌دار در بیومس گیاه مشاهده شد. تنش شوری بر فعالیت‌های متابولیکی گیاه از جمله تقسیم سلولی تأثیرگذار بوده و باعث کاهش تقسیم سلول‌های جدید می‌شود. کاهش تقسیم سلولی می‌تواند در اثر جذب عناصر سمی مانند سدیم نیز اتفاق افتد که باعث ضخیم شدن دیواره سلولی و کاهش تقسیم سلولی و کاهش رشد شاخساره و ریشه می‌شود. تلقیح ترکیب اندوفیتی باکتریایی و قارچی، باعث افزایش تحمل دانهال‌ها نسبت به شوری و کاهش معنی‌دار اثرات سوء ناشی از تنش نسبت به نمونه‌های شاهد شد (Sadeghi *et al*., 2020).

رنگدانه‌های فتوسنتزی

با توجه به جدول تجزیه واریانس (جدول ۳)، در مقدار کلروفیل‌های برگ، کاروتنوئیدها و سطوح شوری در سطح ۰/۱ درصد اختلاف معنی‌داری مشاهده شد. اثر متقابل شوری و اندوفیت بر کلروفیل a، b، (در سطح ۰/۱ درصد) کل و کاروتنوئیدها (در سطح ۵ درصد) معنی‌دار شدند. در بالاترین سطح شوری، ۶۰۰۰ میکروزیمنس بر سانتی‌متر، ترکیب اندوفیتی توانست باعث افزایش ۶۵/۲۱ درصدی کلروفیل a، ۱۱/۹ درصدی کلروفیل b، ۲۸/۳۹ درصدی کلروفیل کل و ۵۹/۰۹ درصدی کاروتنوئیدها نسبت به شاهد شود (جدول ۴).

افزایش شوری باعث کاهش کلروفیل در تمام سطوح شوری شد. نتایج نشان دادند، همبستگی منفی بین سطوح شوری و مقادیرکلروفیل‌ها وجود دارد. شوری بر انتقال الکترون‌های فتوسنتزی تأثیر گذاشته و از فعالیت حداکثری فتوسیستم دو جلوگیری می‌کند. افزایش جذب یون‌های مضر همچون سدیم در اثر افزایش تنش شوری، باعث کاهش جذب عناصر ضروری در ساخت کلروفیل مانند منیزیم، فسفر و آهن می‌شود (Auge *et al*., 2001). کاهش مقدار کلروفیل سبب کاهش مقدار فتوسنتز خواهد شد. کاهش فتوسنتز باعث کاهش رشد گیاه می‌شود. در تحقیقات جوگاوات و همکاران (Jogawat *et al*., 2013) نیز مشاهده شد که استفاده از قارچ *P. indica* توانسته بود باعث افزایش میزان کلروفیل‌های a، b، کل و کاروتنوئیدها در گیاه میزبان شود.

جدول ۱- تجزیه واریانس تلقیح اندوفیت قارچی و باکتریایی *Aspergillus niger* و *Bacillus aquimaris* OD14 روی بیومس دانهال‌های لیموترش رقم مکزیکن لایم تحت تنش شوری

Table 1- ANOVA for the effect of *Aspergillus niger* and *Bacillus aquimaris* OD14 endophytic fungi and bacteria inoculations on the biomass of Mexican lime seedlings in the salinity condition

منابع تغییر S.O.V	درجه آزادی df	نسبت وزن تر به وزن خشک ساقه S.F.W/S.D.W	وزن خشک ساقه S.D.W	وزن تر ساقه S.F.W	نسبت وزن تر به وزن خشک ریشه R.F.W/R.D.W	وزن خشک ریشه R.D.W	وزن تر ریشه R.F.W	نسبت وزن تر به وزن خشک برگ L.F.W/L.D.W	وزن خشک برگ L.D.W	وزن تر برگ L.F.W
شوری Salinity (S)		150.01***	144.8***	1311.7***	120.00*	112.26**	1029.65***	0.00***	1.52***	18.08***
اندوفیت Endophyte (E)		0.00*	22.75***	150.75***	0.00ns	17.54***	395.28***	0.068***	25.42***	410.19***
S×E		0.00ns	2.24***	7.06***	0.00ns	0.52ns	12.64**	0.00***	0.97***	7.79***
خطا Error		0.00	0.04	0.26	0.00	0.31	1.84	0.00	0.031	0.31
ضریب تغییرات C.V (%)		8.88	34.76	10.04	14.72	32.39	17.20	8.49	12.85	6.84

ns، *، ** و ***، به‌ترتیب، غیرمعنی‌دار، معنی‌داری در سطح پنج، یک و یک دهم درصد.

ns, *, ** and ***: non-significant, and significant at $p\leq0.05$, $p\leq0.01$ and $p\leq0.001$, respectively.

جدول ۲- تلقیح اندوفیت قارچی و باکتریایی *Aspergillus niger* و *Bacillus aquimaris* OD14 روی بیومس دانهال‌های لیموترش رقم مکزیکن لایم تحت تنش شوری

Table 2- The effect of the *Aspergillus niger* and *Bacillus aquimaris* OD14 endophytic fungi and bacteria inoculations on the biomass of Mexican lime seedlings in the salinity condition (LSD, $p \leq 0.05$)

شوری (μS.cm^{-1})		وزن خشک ساقه S.D.W (gr)	وزن تر ساقه S.F.W (gr)	وزن خشک ریشه R.D.W (gr)	وزن تر ریشه R.F.W (gr)	وزن خشک برگ L.D.W (gr)	وزن تر برگ L.F.W (gr)
0	شاهد Control	1.53^{cd}	3.11^{d}	1.26^{d}	5.03^{d}	0.45^{e}	4.99^{e}
	اندوفیت Endophyte	5.26^{a}	11.29^{a}	3.81^{a}	17.22^{a}	3.42^{a}	15.26^{a}
2000	شاهد Control	1.13^{d}	2.79^{e}	0.91^{e}	4.26^{e}	0.43^{e}	4.12^{e}
	اندوفیت Endophyte	2.5^{b}	5.81^{c}	2.56^{b}	10.97^{b}	2.54^{b}	14.33^{b}
4000	شاهد Control	0.91^{e}	2.44^{ef}	0.79^{f}	3.75^{f}	0.33^{ef}	3.69^{ef}
	اندوفیت Endophyte	1.9^{c}	6.74^{e}	1.79^{c}	9.26^{bc}	1.79^{c}	9.4^{d}
6000	شاهد Control	0.84^{e}	2.2^{ef}	0.41^{g}	2.32^{g}	0.17^{g}	3.43^{ef}
	اندوفیت Endophyte	2.54^{b}	6.75^{b}	2.14^{b}	10.38^{b}	1.65^{cd}	10.41^{c}

اثر شوری و اندوفیت بر صفات بیوشیمیایی

نتایج تجزیه واریانس مقدار نسبی آب برگ نشان دادند، اندوفیت و سطوح مختلف شوری در سطح احتمال ۰/۱ درصد اثر معنی‌داری نشان دادند. در نمونه‌های شاهد و تیمار شده، با افزایش سطح شوری، از میزان نسبی آب برگ کاسته شد. این کاهش می‌تواند به‌علت کاهش پتانسیل آب در اثر افزایش یون‌های نمک، کاهش رشد ریشه‌های مویین در اثر کاهش تقسیمات سلولی و رسوب یون‌های سمی همچون سدیم در ریشه باشد. با توجه به نتایج، بین میزان نسبی آب برگ و افزایش سطح شوری همبستگی منفی وجود داشت. با افزایش تنش شوری، محتوی نسبی آب کاهش یافت. کاهش محتوی نسبی آب در بافت‌های گیاه باعث تغییرات متابولیکی و فیزیولوژیک در گیاه و محدود شدن رشد گیاه می‌شود. از جمله تغییرات متابولیکی که در گیاه تحت تنش رخ می‌دهد، اختلال در روند هدایت روزنه‌ای می‌باشد. کاهش هدایت روزنه‌ای باعث کاهش ورود دی اکسید کربن به درون بافت برگ‌ها شده و در نتیجه کاهش فتوسنتز را به همراه خواهد داشت (Atteya, 2003). در شوری ۶۰۰۰ میکروزیمنس بر سانتی‌متر، ترکیب اندوفیتی توانست باعث افزایش ۴۱/۸۶ درصدی محتوی نسبی آب دانهال‌ها نسبت به نمونه شاهد شود (جدول ۲).

یکی از اثرات زیان‌بار شوری بر فعالیت‌های متابولیکی گیاه، تخریب پروتئین‌ها می‌باشد. از دلایل دیگری که می‌توان به تجمع بیشتر مولکول‌های آب درون بافت برگ دانهال‌های تلقیح شده نسبت داد، تجمع مولکول‌های پرولین، پروتئین و یا قندهای بیشتر درون بافت آن‌ها باشد. با بالا رفتن میزان این مولکول‌ها در درون سلول گیاهی، فشار اسمزی آن‌ها منفی‌تر شده و در نتیجه آب بیشتری را به سمت بافت‌ها جذب می‌کنند؛ که این امر خود باعث بالا رفتن محتوی نسبی آب در گیاه می‌شود (Moustakas *et al.*, 2011; García- Sánchez *et al.*, 2007). نتایج تجزیه واریانس مقدار پروتئین کل برگ نشان داد، اثر اندوفیت و شوری در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌داری بود. با افزایش سطوح شوری، میزان پروتئین کل موجود در دانهال‌های تلقیح شده و شاهد کاهش یافت، اما در آخرین سطح شوری، میزان پروتئین کل موجود در نمونه‌های تلقیح شده به‌طور معنی‌داری بیشتر از (۲۲/۶۲ درصد) نمونه‌های شاهد بود (جدول ۴).

اکسیداسیون اسیدهای چرب غیراشباع، ترکیباتی مثل مالون دی‌آلدئید تولید می‌کند که شاخصی از میزان صدمه اکسیداتیو به شمار می‌رود. تجزیه واریانس نتایج بررسی میزان پراکسیداسیون غشاء سلولی گیاهان نشان داد، با افزایش سطوح شوری، میزان تولید مالون‌دی‌آلدئید افزایش پیدا کرده است. اما میزان افزایش این ترکیب در نمونه‌های تلقیح شده به‌طور معنی‌داری از نمونه‌های شاهد کمتر بود (جدول ۳). نتایج تجزیه واریانس مقدار مالون‌دی‌آلدئید نشان داد، اثر اندوفیت و شوری در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌داری بود. اندوفیت‌ها توانسته بودند به‌طور معنی‌داری باعث استحکام دیواره سلولی نسبت به نمونه شاهد شوند. در تحقیقات گذشته نیز نشان داده شده است که اعمال اندوفیت‌های قارچی به گیاه گندم و برنج،

توانسته بود باعث کاهش تولید ترکیب مالون‌دی‌آلدئید در آن‌ها شود (Zhang & Nan, 2007Shukla *et al.*, 2012 ;) که نشانگر تأثیر آن‌ها در افزایش پایداری غشاء می‌باشد. مقدار پراکسیده شدن لیپیدها، یک رابطه تعادلی بین تولید ROSها و فعالیت آنتی‌اکسیدانی در سلول و یا بافت می‌باشد. نشان داده شده است که ROSها می‌توانند بر بیوسنتز هورمون ABA و سیگنال‌هایی که باعث ورود یون‌ها Ca^{+2} به درون سلول‌های محافظ روزنه می‌شوند تأثیر بگذارند و باز ماندن روزنه‌ها را کاهش دهند. با افزایش تولید ROSها و سنتز بیشتر هورمون ABA در شرایط تنش شوری آب، روزنه‌ها بیشتر بسته می‌شوند (Kaya *et al.*, 2006). در آخرین سطح شوری، ترکیب اندوفیت توانسته بود به‌میزان ۳۵/۱۸ درصد تولید مالون‌دی‌آلدئید را در دانهال‌های تلقیح شده نسبت به شاهد کاهش دهد (جدول ۴). نتایج حاصل با یافته‌های صادقی و همکاران (Sadeghi *et al.*, 2020) قرابت نزدیکی داشت.

نتایج تجزیه واریانس مقدار قندهای کل محلول نشان داد، اثر اندوفیت و شوری در سطح احتمال ۰/۰۱ درصد معنــی‌داری بود. در شوری ۶۰۰۰ میکروزیمنس بر سانتی‌متر، ترکیب اندوفیتی توانسته بود باعث افزایش ۱۷/۸۵ درصدی میزان قندهای محلول در نمونه‌های تلقیح شده نسبت به شاهد شود (جدول ۴).

افزایش میزان قندهای محلول در سلول‌های گیاهی، باعث کاهش اثرات سوء شوری از جمله کاهش محتوی نسبی آب می‌شود. نمونه‌های تلقیح شده دارای محتوی نسبی آب بالاتری نسبت به نمونه‌های شاهد بودند. در تحقیقات پیشین که اثر تنش شوری و خشکی در انواع مرکبات مورد بررسی قرار گرفته شده بود، مشاهده شد که اعمال تنش باعث افزایش میزان قندهای محلول در مرکبات می‌شود که با نتایج حاصل از این پژوهش مطابقت دارد (Xie *et al.*, 2012 García- Sánchez *et al.*, 2007;).

اثر شوری و اندوفیت بر ظرفیت آنتی اکسیدانی

نتایج تجزیه واریانس اثر شوری و اندوفیت بر ظرفیت آنتی اکسیدانی نشان دادند، اثر اندوفیت و شوری در تمام آنزیم‌های آنتی اکسیدانت، در سطح احتمال ۰/۰۱ درصد معنــی‌داری بود. آنزیم پراکسیداز یکی از سیستم‌های مهمی است که باعث حذف پراکسید هیدروژن در گیاهان می‌شوند. تأثیر افزایش آنزیم پراکسیداز تحت تنش و تأثیر بر کاهش پراکسیداسیون لیپیدها به اثبات رسیده است (Strobel *et al.*, 2004). افزایش این آنزیم در گیاهان، نقش حمایت کننده آنزیم از گیاه در شرایط تنش شوری را ایفا می‌کند. در سطوح مختلف شوری (صفر، ۲۰۰۰، ۴۰۰۰ و ۶۰۰۰ میکروزیمنس بر سانتی‌متر)، اعمال ترکیب اندوفیتی توانست به‌ترتیب باعث افزایش ۱۷۷/۸۲، ۱۷۳/۳۳، ۱۴۲/۱ و ۶۶/۸ درصدی میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز نسبت به شاهد شود (جدول ۴).

دانهال‌های تلقیح شده دارای مقادیر بالاتر فعالیت آنزیمی سوپراکسید دیسموتاز نسبت به شاهد بودند. به‌نظر می‌رسد، از دلایلی که می‌توان برای افزایش فعالیت این آنزیم‌ها در شرایط تنش در نظر گرفت، تأثیر اندوفیت‌ها بر بیان ژن‌های سنتز کننده این آنزیم‌ها و افزایش فعالیت آن‌ها باشد (Hayat *et al.*, 2007 Ali *et al.*, 2007;). افزایش فعالیت آنزیم‌ها آنتی‌اکسیدانی، باعث افزایش پایداری غشا در دانهال‌های تلقیح شده و کاهش تولید مالون‌دی‌آلدئد در آن‌ها نسبت به نمونه‌های شاهد شد. نتایج نشان دادند، در سطوح مختلف شوری اعمال شده، ترکیب اندوفیتی قارچی و باکتریایی توانست به‌ترتیب باعث افزایش ۵۷۲/۱۵ (۵/۷ برابر)، ۱۵۰/۰۹، ۱۶۶/۵۵ و ۶۰/۰۱ درصدی میزان فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز نسبت به شاهد شود (جدول ۴). در تحقیقات پیشین نیز این افزایش فعالیت آنزیمی به اثبات رسیده است (Hayat *et al.*, Ali *et al.*, 2007 2007;). این محققین گزارش کردند، باکتری‌های اندوفیت استخراج شده از درختان حرا، باعث افزایش فعالیت آنزیمی در گیاهچه‌های گوجه فرنگی تلقیح شده با این اندوفیت تحت شرایط شوری شدند.

اسکوربیک‌پراکسیداز نیز از جمله آنزیم‌های مهمی است که نقش اساسی در محافظت گیاه در برابر تنش‌ها را ایفا می‌کند. آنزیم‌هایی چون اسکوربیک‌پراکسیداز، جزو آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی هستند که در تنش‌ها اکسیداتیو، از طریق مکانیسم سم‌زدایی از صدمه دیدن گیاه جلوگیری می‌کنند (Gill *et al.*, 2013 Asada, 1994;). در این چرخه، آن‌ها از طریق احیای H_2O_2 باعث تبدیل این ترکیب به آب می‌شوند. افزایش این آنزیم در گیاهان، نقش حمایت کننده از گیاه در شرایط تنش شوری را ایفا می‌کند. دانهال‌های تلقیح شده با اندوفیت قارچی و باکتریایی، دارای مقادیر بالاتر فعالیت آنزیمی پراکسیداز بودند. در این تحقیق، در شوری‌های مختلف اعمال شده، ترکیب اندوفیتی توانست به‌ترتیب باعث افزایش ۱۱۸/۴۱، ۵۰/۲۶، ۲۵/۱۱ و ۲۴/۸۸ درصدی میزان فعالیت آنزیم اسکوربیک پراکسیداز نسبت به شاهد شود (جدول ۵). در تحقیقات پیشین نیز این افزایش فعالیت آنزیمی به اثبات رسیده است (Hayat *et al.*, Ali *et al.*, 2007 2007;).

جدول ۳- تجزیه واریانس اثر تلقیح اندوفیت قارچی و باکتریایی *Aspergillus niger* و *Bacillus aquimaris* OD14 اندوفیت بر رنگدانه‌های فتوسنتزی و صفات بیوشیمیایی دانهال‌های مکزیکن لایم تحت تنش شوری

Table 3- ANOVA for the *Aspergillus niger* and *Bacillus aquimaris* OD14 endophytic fungi and bacteria inoculations on the photosynthesis pigments and biochemical characteristics of Mexican lime seedlings in the salinity condition

منابع تغییر S.O.V	قندهای محلول Sluble sugars	مالون دی آلدئید MDA	پروتئین Protein	محتوی نسبی آب RWC	کاروتنویید Carotenoids	کلروفیل کل Total chlorophyll	کلروفیل b Chlorophyll b	کلروفیل a Chlorophyll a
شوری Salinity (S)	1204.5***	23.57***	2640.02***	290.45***	24.01***	0.71***	0.081***	0.131***
اندوفیت Endophyte (E)	1176***	47.82***	74.65***	3608.85***	0.13***	0.16***	0.029***	0.36***
S×E	523***	1.22*	3.5*	516.14***	0.00*	0.00*	0.01***	0.02***
خطا Error	1	0.37	1.37	7.52	0.00	0.00	0.00	0.00
ضریب تغییرات C.V (%)	0.8	10.64	3.72	7.25	2.95	3.17	1.7	1.28

* و ***، به‌ترتیب، معنی‌داری در سطح پنج و یک دهم درصد.

* and ***: Significant at $p \leq 0.05$ and $p \leq 0.01$ respectively.

جدول ٤- تأثیر تلقیح اندوفیت قارچی و باکتریایی *Aspergillus niger* و *Bacillus aquimaris* OD14 روی رنگدانه‌های فتوسنتزی و صفات بیوشیمیایی دانهال‌های لیموترش رقم مکزیکن لایم تحت تنش شوری

Table 4- The effect of the *Aspergillus niger* and *Bacillus aquimaris* OD14 endophytic fungi and bacteria inoculation on Photosynthesis pigments and biochemical characteristics of Mexican lime Seedlings in salinity condition (LSD, $p \leq 0.05$)

شوری Salinity ($\mu S.cm^{-1}$)		قندهای محلول Sluble sugars (mg/g fw)	مالون دی آلدئید MDA (nmol/g dry w)	پروتئین Protein (%)	محتوی نسبی آب WC (%)	کاروتنویید Carotenoids (mg/g fw)	کلروفیل کل Total chlorophyll (mg/g fw)	کلروفیل b Chlorophyll b (mg/g fw)	کلروفیل a Chlorophyll a (mg/g fw)
0	شاهد Control	93^f	4.91^e	31.14^c	77.14^b	0.32^bc	1.6^b	0.69^a	0.91^ab
	اندوفیت Endophyte	123^c	1.43^g	35.05^a	93.7^a	0.46^a	1.71^a	0.7^a	0.99^a
2000	شاهد Control	115^d	6.96^b	30.24^cd	75.84^de	0.28^c	1.52^c	0.65^b	0.72^c
	اندوفیت Endophyte	134^bc	4.01^f	32.35^b	88.38^b	0.44^a	1.64^b	0.68^a	0.96^b
4000	شاهد Control	149^a	7.32^b	28.48^ef	62.45^f	0.24^d	1.07^e	0.44^d	0.53^d
	اندوفیت Endophyte	136^b	5.81^d	31.06^c	87.75^b	0.4^ab	1.27^d	0.63^bc	0.9b^c
6000	شاهد Control	112^e	9.52^a	24.26^g	57.57^g	0.22^de	0.81^f	0.42^de	0.46^e
	اندوفیت Endophyte	132^bc	6.17^cd	29.75^e	81.67^c	0.35^b	1.04^e	0.47^c	0.76^c

به‌نظر می‌رسد در مرکبات، تنظیم کننده‌های مخصوصی برای فعالیت آنزیم‌ها تحت شرایط تنش شوری وجود دارد. این پاسخ‌ها شامل روابط پیچیده‌ای هستند که نیاز به مطالعه و بررسی‌های بیشتری دارد. گوئتا داها و همکاران (Gueta-Dahan *et al.*, 1997) نشان دادند، تنش اکسیداتیو در مرکبات، با فعالیت بالای آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی چون سوپراکسید دیسموتاز و گلوتاتیون ردوکتاز و کاهش اسکوربیک پراکسیداز همراه بوده است. در بررسی انجام شده، در سطوح مختلف شوری، اعمال ترکیب اندوفیت توانست به‌ترتیب باعث افزایش ۸۰/۹۱، ۳۲/۱، ۱۳۲/۰۴ و ۲۳۲/۴۱ درصدی میزان فعالیت آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز نسبت به شاهد شود (جدول ۶).

در مقابله گیاه با تنش‌های زیستی و غیرزیستی و شرایط نامساعد محیطی، هر چه ظرفیت آنتی‌اکسیدانی گیاه بالاتر باشد، توانایی گیاه برای مقابله با شرایط نامساعد بالاتر خواهد بود. عدم تجمع رادیکال-های آزادی چون O^- یا H_2O_2 در گیاهان تحت شرایط تنش، به‌دلیل وجود آنزیم‌های آنتی اکسیدانی چون کاتالاز می‌باشد (Naveed *et al.*, 2014). کاتالازها پروتئین‌های آنزیمی هستند که سلول‌های زنده را در برابر صدمات اکسیداتیو محافظت می‌کنند و باعث تغییر O^- و H_2O_2 به شکل O_2 و H_2O می‌شوند (Halo *et al.*, 2015). در

تحقیق حاضر، در سطوح مختلف شوری، اعمال ترکیب اندوفیتی توانست به‌ترتیب باعث افزایش ۲۷۳/۹۳، ۵۵/۴۱، ۵۱/۲ و ۱۴۱/۸۴ درصدی میزان فعالیت آنزیم کاتالاز نسبت به شاهد شود (جدول ۵). از آنجا که در زمان تنش، کاتالاز به هموستازی اکسیژن فعال کمک می‌کند، میزان فعالیت این آنزیم در زمان تنش افزایش می‌یابد (Magbanua *et al.*, 2007). محققان بر این باورند که افزایش میزان فعالیت آنزیم کاتالاز به نوع بافت گیاه، رقم گیاه، شرایط آزمایش، شدت تنش و موارد دیگر بستگی دارد. اما اکثر محققین نظر بر افزایش میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در شرایط تنش نسبت به شرایط غیر تنش دارند.

جدول ۵- تجزیه واریانس اثر تلقیح اندوفیت قارچی و باکتریایی *Aspergillus niger* و *Bacillus aquimaris* OD14 اندوفیت بر ظرفیت آنتی اکسیدانی بیوشیمیایی دانهال‌های لیموترش رقم مکزیکن لایم تحت تنش شوری

Table 5- ANOVA for the *Aspergillus niger* and *Bacillus aquimaris* OD14 endophytic fungi and bacteria inoculations on the antioxidant capacity of Mexican lime Seedlings in salinity condition

منابع تغییر S.O.V	اسکوربیک پراکسیداز Ascorbate peroxidase	گلوتاتیون ردوکتاز Glutathione reductase	سوپراکسیداز Superoxide dismutase	پراکسیداز peroxidase	کاتالاز Catalase
شوری Salinity (S)	129913.47***	311048.1***	71832.22***	399.99***	648.1***
اندوفیت Endophyte (E)	357530.09***	2975.8***	181219.52***	3071.34***	4026.15***
S×E	15245.16***	535.85***	20943.12***	81.62***	22.28***
خطا Error	13.37	0.89	0.011	0.94	1.16
ضریب تغییرات C.V (%)	0.54	3.39	0.047	3.62	10.64

***، معنی‌داری در سطح یک دهم درصد

***, Significant at $p \leq 0.01$

جدول ٦- تأثیر تلقیح اندوفیت قارچی و باکتریایی *Aspergillus niger* و *Bacillus aquimaris* OD14 روی ظرفیت آنتی اکسیدانی دانهال‌های لیموترش رقم مکزیکن لایم تحت تنش شوری

Table 6- The effect of the *Aspergillus niger* and *Bacillus aquimaris* OD14 endophytic fungi and bacteria inoculation on antioxidant capacity of Mexican lime Seedlings in salinity condition (LSD, $p \leq 0.05$)

شوری Salinity ($\mu S.cm^{-1}$)		اسکوربیک پراکسیداز Ascorbate peroxidase (units/mg dry wt)	گلوتاتیون ردوکتاز Glutathione reductase (units/mg dry wt)	سوپراکسیداز Superoxide dismutase (units/mg dry wt)	پراکسیداز peroxidase (units/mg dry wt)	کاتالاز Catalase (units/mg dry wt)
0	شاهد Control	324.28^{f}	10.48^{g}	22.66^{h}	9.83^{g}	15.27^{g}
	اندوفیت Endophyte	708.57^{c}	18.96^{e}	153.31^{e}	27.31^{d}	57.3^{c}
2000	شاهد Control	492.85^{e}	16.29^{f}	145.69^{f}	15.19^{f}	44.3^{e}
	اندوفیت Endophyte	739.28^{bc}	21.52^{c}	364.37^{b}	41.52^{b}	68.85^{a}
4000	شاهد Control	614.28^{d}	19.38^{d}	198.67^{d}	21.92^{e}	41.5^{f}
	اندوفیت Endophyte	768.57^{d}	44.97^{b}	529.57^{a}	73.07^{a}	62.75^{b}
6000	شاهد Control	769.28^{b}	20.44^{c}	132.45^{g}	30.64^{c}	19.5^{h}
	اندوفیت Endophyte	960.71^{a}	68.15^{a}	211.94^{c}	51.11^{f}	67.16^{d}

نتیجه‌گیری

به‌طور کلی، نتایج این مطالعه نشان دادند، لیموترش رقم مکزیکن لایم، گیاهی حساس به تنش شوری می‌باشد؛ اما تلقیح دانهال‌ها با اندوفیت‌های قارچی و باکتریایی توانست نتایج خوبی را حاصل نماید. ترکیب اندوفیتی باعث ارتقاء صفات رشدی، افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، میزان قندهای کل محلول، محتوی نسبی آب برگ، رنگدانه‌های فتوسنتزی و پروتئین نسبت به نمونه شاهد در شرایط تنش شوری شد. طبق منابع موجود، اندوفیت قارچی *A. niger* و باکتری‌های جنس *Bacillus* از مهم‌ترین و اصلی‌ترین جنس‌های استخراج شده از اکوسیستم‌های دریایی و ماکروجلبک‌ها می‌باشند. اکثر متابولیت‌های حاصل از اندوفیت‌های قارچی حاصل از دریا نیز، از جنس *A. niger* بوده است. این قارچ تحمل بالایی نسبت به غلظت‌های مختلف کلرید سدیم موجود در محیط‌کشت دارا می‌باشد. نتایج آزمون تحمل تنش شوری جدایه‌ها در شرایط آزمایشگاه، نشان دادند که جدایه‌ها قادر به تحمل شوری سه مولار نمک در محیط‌کشت خود بودند که در نوع خود بی‌نظیر است. این درحالی‌است که شوری آب دریا کمتر از یک مولار می‌باشد. اندوفیت‌ها با موفقیت توانستند، در بافت دانهال‌های مکزیکن لایم تلقیح شده، استقرار یابند و باعث بهبود صفات مورفولوژیک، فیزیولوژیک، بیوشیمیایی، آنتی‌اکسیدانی، بهبود رنگدانه‌های فتوسنتزی چه در شرایط اعمال تنش و چه در شرایط غیر تنش شوند. همچنین، بررسی‌ها نشان دادند، سه مرحله تلقیح در طول سه هفته (هفته‌ای یک‌بار) زمانی مناسب برای تلقیح و استقرار اندوفیت‌ها بوده است. نتایج حاصل، این فرضیه را اثبات می‌کنند که استفاده از اندوفیت‌های قارچی و باکتریایی، گامی مؤثر در افزایش رشد و تحمل به تنش شوری در دانهال‌های مکزیکن لایم تلقیح شده بود. بر اساس یافته‌های پژوهش حاضر، اندوفیت‌های قارچی و باکتریایی، این قابلیت را دارند که به‌عنوان گزینه‌ای مناسب برای افزایش تحمل گیاهان نسبت به تنش‌های محیطی از جمله شوری مطرح شوند. این موضوع می‌تواند به‌عنوان یک روش مناسب در جهت ایجاد کشاورزی پایدار و دوستدار محیط‌زیست، در کاهش اثرات منفی کودهای شیمیایی مطرح شود.

با وجود اینکه در برخی کشورها از جمله، چین، کره، آمریکا و هند در زمینه استخراج و شناسایی اندوفیت‌های جلبک‌ها و دیگر موجودات زیستگاه‌های آبی و ترکیبات فعال طبیعی آن‌ها به‌طور جدی کار شده است، در ایران کمتر به این مسئله پرداخته شده است. اگر چه این تحقیق اولین گزارش از اندوفیت‌های قارچی و باکتریایی همزیست با جلبک‌های موجود در خلیج فارس و دریای عمان می‌باشد، اما تحقیقات بیشتری در زمینه شناسایی، عملکرد و جنبه‌های اکولوژیکی این نوع اندوفیت‌ها را می‌طلبد. برخی از این گونه‌های شناسایی شده پتانسیل افزایش تحمل گیاهان نسبت به شرایط تنش شوری را دارا می‌باشند. همچنین، بهتر است که ارتباط پیچیده موجود بین جلبک‌ها و باکتری‌ها و قارچ‌های اندوفیت همزیست با آن‌ها مورد بررسی قرار گیرد. علاوه‌بر این، مخزن میکروبی موجود در جلبک‌های دریایی می‌تواند گام مهمی در کشف ترکیبات فعال زیستی جهت تولید تجاری داروهای باارزش باشد.

سپاسگزاری

در اینجا جا دارد از دانشگاه هرمزگان و آزمایشگاه محیط‌زیست استان هرمزگان تقدیر و تشکر نماییم. همچنین از خانم مهندس رام، آقای دکتر ربیعی و آقای مهندس خسروی که در نمونه‌برداری و پیشبرد پروژه همکاری صمیمانه داشتند، کمال تشکر را داریم.

References

1- Ali, A., Shahzad, R., Khan, A.L., Halo, B.A., Al-Yahyai, R., Al-Harrasi, A., Al-Rawahi, A., & Lee, I.J. (2017). Endophytic bacterial diversity of *Avicennia marina* helps to confer resistance against salinity stress in *Solanum lycopersicum*. *Journal of Plant Interactions*, *12*(1), 312–322. https://doi.org/10.1080/17429145.2017.1362051

2- Ali, B., Hayat, S., & Ahmad, A. (2007). 28-Homobrassinolide ameliorates the saline stress in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Environmental and Experimental Botany*, *59*(2), 217–223. https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2005.12.002

3- Al-Yassin, A. (2005). Adverse effects of salinity on *citrus*. *International Journal of Agriculture & Biology*, *7*(4), 668-680.

4- Arnon, D.I. (1949). Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology*, *24*(1), 1-15.

5- Asada, K. (1994). Production and action of active oxygen species in photosynthetic tissues. *Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defense Systems in Plants*, 77–104.

6- Atteya, A.M. (2003). Alteration of water relations and yield of corn genotypes in response to drought stress. Bulgarian. *Journal of Plant Physiology*, *29*(1-2), 63–76.

7- Auge, R.M., Stodola, A.J., Tims, J.E., & Saxton, A.M. (2001). Moisture retention properties of a mycorrhizal soil. *Plant and Soil*, *230*(1), 87–97. https://doi.org/10.1023/A:1004891210871

8- Becana, M., Aparicio-Tejo, P., Irigoyen, J.J., & Sanchez-Diaz, M. (1986). Some enzymes of hydrogen peroxide metabolism in leaves and root nodules of *Medicago sativa*. *Plant Physiology*, *82*(4), 1169–1171.

9- Berg, G. (2009). Plant–microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *84*(1), 11–18.

10- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, *72*(1-2), 248–254.

11- Chance, B., & Maehly, AC. (1955). Assay of catalases and peroxidases. In: Colowick, S.P., Kaplan, N.O. (Eds.) *Methods in Enzymology*. Academic Press, New York, 764–775.

12- Del Rio, L. (2015). ROS and RNS in plant physiology: an overview. *Journal of Experimental Botani*, *66*, 2827–2837.

13- Dhindsa, R.S., Plumb-Dhindsa, P.A.M.E.L.A., & Thorpe, T.A. (1981). Leaf senescence: correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation, and decreased levels of superoxide dismutase and catalase. *Journal of Experimental Botany*, *32*(1), 93–101. https://doi.org/10.1093/jxb/32.1.93

14- Dodd, I.C., & Pérez-Alfocea, F. (2012). Microbial amelioration of crop salinity stress. *Journal of Experimental Botany*, *63*(9), 3415–3428. https://doi.org/10.1093/jxb/ers033

15- Ennab, H.A. (2016). Effect of humic acid on growth and productivity of Egyptian lime trees (*Citrus aurantifolia* swingle) under salt stress conditions. *Journal of Agriculture Research Kafr El-Sheikh University*, *42*(4), 494–505.

16- Flewelling, A.J., Currie, J., Gray, C.A., & Johnson, J.A. (2015). Endophytes from marine macroalgae: promising sources of novel natural products. *Current Science*, 88–111.

17- Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO.org. (n.d.). Retrieved June 12. 2015.

18- García- Sánchez, F., Syvertsen, J.P., Gimeno, V., Botía, P., & Perez- Perez, J.G. (2007). Responses to flooding and drought stress by two citrus rootstock seedlings with different water- use efficiency. *Physiologia Plantarum*, *130*(4), 532–542. https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2007.00925.x

19- Gill, S.S., Anjum, N.A., Hasanuzzaman, M., Gill, R., Trivedi, D.K., Ahmad, I., Pereira, E., & Tuteja, N. (2013). Glutathione and glutathione reductase: a boon in disguise for plant abiotic stress defense operations. *Plant Physiology and Biochemistry*, *70*, 204–212. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.05.032

20- Gueta-Dahan, Y., Yaniv, Z., Zilinskas, B.A., & Ben-Hayyim, G. (1997). Salt and oxidative stress: similar and specific responses and their relation to salt tolerance in citrus. *Planta*, *203*(4), 460–469. https://doi.org/10.1007/s004250050215

21- Halo, B.A., Khan, A.L., Waqas, M., Al-Harrasi, A., Hussain, J., Ali, L., Adnan, M., & Lee, I.J. (2015). Endophytic bacteria (*Sphingomonas* sp. LK11) and gibberellin can improve *Solanum lycopersicum* growth and oxidative stress under salinity. *Journal of Plant Interactions*, *10*(1), 117–125. https://doi.org/10.1080/17429145.2015.1033659

22- Hayat, S., Ali, B., Hasan, S.A., & Ahmad, A. (2007). Brassinosteroid enhanced the level of antioxidants under cadmium stress in *Brassica juncea*. *Environmental and Experimental Botany*, *60*(1), 33–41. https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2006.06.002

23- Heidarvand, L., & Amiri, R.M. (2010). What happens in plant molecular responses to cold stress?. *Acta Physiologiae Plantarum*, *32*(3), 419–431. https://doi.org/10.22059/ijfcs.2019.281022.654611

24- Hodges, D.M., DeLong, J.M., Forney, C.F., & Prange, R.K. (1999). Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta*, *207*(4), 604–611. https://doi.org/10.1007/s004250050524

25- Jogawat, A., Saha, S., Bakshi, M., Dayaman, V., Kumar, M., Dua, M., Varma, A., Oelmüller, R., Tuteja, N., & Johri, A.K. (2013). *Piriformospora indica* rescues growth diminution of rice seedlings during high salt stress. *Plant Signaling & Behavior*, *8*(10), 26891. https://doi.org/10.4161/psb.26891

26- Joshi, R., Mangu, V.R., Bedre, R., Sanchez, L., Pilcher, W., Zandkarimi, H., & Baisakh, N. (2015). Salt adaptation mechanisms of halophytes: improvement of salt tolerance in crop plants, In Elucidation of abiotic stress signaling in plants. *Springer*, *New York*, *NY*, 243–279.

27- Kaya, M.D., Okçu, G., Atak, M., Cıkılı, Y., & Kolsarıcı, Ö. (2006). Seed treatments to overcome salt and drought stress during germination in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *European Journal of Agronomy*, *24*(4), 291–295. https://doi.org/10.1016/j.eja.2005.08.001

28- Khan, A.L., Waqas, M., Asaf, S., Kamran, M., Shahzad, R., Bilal, S., Khan, M.A., Kang, S.M., Kim, Y.H., Yun, B.W., & Al-Rawahi, A. (2017). Plant growth-promoting endophyte *Sphingomonas* sp. LK11 alleviates salinity stress in *Solanum pimpinellifolium*. *Environmental and Experimental Botany*, *133*, 58–69. https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2016.09.009

29- Khan, A.L., Hamayun, M., Kang, S.M., Kim, Y.H., Jung, H.Y., Lee, J.H., & Lee, I.J. (2012). Endophytic fungal association via gibberellins and indole acetic acid can improve plant growth under abiotic stress: an example of *Paecilomyces formosus* LHL10. *BMC Microbiology*, *12*(1), 1–14. https://doi.org/10.1186/1471-2180-12-3

30- Kochert, G. (1978). Carbohydrate determination by the phenol-sulfuric acid method. Handbook of phycological methods. *Phycological and Biochemical Methods*, 95. https://doi.org/10.1016/j.ab.2004.12.001

31- Krishna, G., Singh, B.K., Kim, E.K., Morya, V.K., & Ramteke, P.W. (2015). Progress in genetic engineering of peanut (*Arachis hypogaea* L.) A review. *Plant Biotechnology Journal*, *13*(2), 147–162. https://doi.org/10.1111/pbi.12339

32- Li, Y. (2008). Kinetics of the antioxidant response to salinity in the halophyte *Limonium bicolor*. *Plant Soil Environent*, *54*(11), 493–497. https://doi.org/10.17221/434-PSE

33- MacArtain, P., Gill, C.I., Brooks, M., Campbell, R., & Rowland, I.R. (2007). Nutritional value of edible seaweeds. *Nutrition Reviews*, *65*(12), 535–543. https://doi.org/10.1301/nr.2007.dec.535-543

34- Magbanua, Z.V., De Moraes, C.M., Brooks, T.D., Williams, W.P., & Luthe, D.S. (2007). Is catalase activity one of the factors associated with maize resistance to *Aspergillus flavus*?. *Molecular Plant-microbe Interactions*, *20*(6), 697–706. https://doi.org/10.1094/MPMI-20-6-0697

35- Meggio, F., Prinsi, B., Negri, A.S., Simone, Di Lorenzo, G., Lucchini, G., Pitacco, A., Failla, O., Scienza, A., Cocucci, M., & Espen, L. (2014). Biochemical and physiological responses of two grapevine rootstock genotypes to drought and salt treatments. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, *20*(2), 310–323. https://doi.org/10.1111/ajgw.12071

36- Mišurcová, L., Buňka, F., Ambrožová, J.V., Machů, L., Samek, D., & Kráčmar, S. (2014). Amino acid composition of algal products and its contribution to RDI. *Food Chemistry*, *151*, 120–125. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.11.040

37- Morgan, J.A. (1984). Interaction of water supply and N in wheat. *Plant Physiology*,*76*(1), 112–117.

38-Moustakas, N.K., Akoumianakis, K.A., & Passam, H.C. (2011). Patterns of dry biomass accumulation and nutrient uptake by okra (*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench.) under different rates of nitrogen application. *Australian Journal of Crop Science*, *5*(8), 993–1000.

39- Munns, R., & Tester, M. (2008). Mechanisms of salinity tolerance. *Annual. Rev, Plant Biology*, *59*, 651–681. https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092911

40- Nakano, Y., & Asada, K. (1981). Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and Cell Physiology*, *22*(5), 867–880. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a076232

41- Naveed, M., Mitter, B., Reichenauer, T.G., Wieczorek, K., & Sessitsch, A. (2014). Increased drought stress resilience of maize through endophytic colonization by *Burkholderia phytofirmans* PsJN and *Enterobacter* sp. FD17. *Environmental and Experimental Botany*, *97*, 30–39.

42- Pal, S., Singh, H.B., Farooqui, A., & Rakshit, A. (2015). Fungal biofertilizers in Indian agriculture: perception, demand and promotion. *Journal of Eco-friendly Agriculture*, *10*(2), 101–113.

43- Peng, Z., Xin, L., & Bin-Gui, W. (2016). Secondary metabolites from the marine algal-derived endophytic fungi. *Chemical Diversity and Biological Activity*, *82*(09/10), 832–842. https://doi.org/10.1055/s-0042-103496

44- Sadeghi, F., Samsampour, D., Seyahooei, M.A., Bagheri, A., & Soltani, J. (2020). Fungal endophytes alleviate drought-induced oxidative stress in mandarin (*Citrus reticulata* L.): Toward regulating the ascorbate–glutathione cycle. *Scientia Horticulturae*, *261*, 108991. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.108991

45- Saravanakumar, D., & Samiyappan, R. (2007). ACC deaminase from *Pseudomonas fluorescens* mediated saline resistance in groundnut (*Arachis hypogea*) plants. *Journal of Applied Microbiology*, *102*(5), 1283–1292. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03179.x

46- Shukla, N., Awasthi, R.P., Rawat, L., & Kumar, J. (2012). Biochemical and physiological responses of rice (*Oryza sativa* L.) as influenced by *Trichoderma harzianum* under drought stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, *54*, 78–88. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2012.02.001

47- Smith, I.K., Vierheller, T.L., & Thorne, C.A. (1988). Assay of glutathione reductase in crude tissue homogenates using 5, 5′-dithiobis (2-nitrobenzoic acid). *Analytical Biochemistry*, *175*(2), 408–413. https://doi.org/10.1016/0003-2697(88)90564-7

48- Strobel, G., & Daisy, B. (2003). Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *67*(4), 491–502. https://doi.org/10.1128%2FMMBR.67.4.491-502.2003

49- Strobel, G., Daisy, B., Castillo, U., & Harper, J. (2004). Natural products from endophytic microorganisms. *Journal of Natural Products*, *67*(2), 257–268. https://doi.org/10.1021/np030397v

50- Suryanarayanan, T.S., Venkatachalam, A., Thirunavukkarasu, N., Ravishankar, J.P., Doble, M., & Geetha, V. (2010). Internal mycobiota of marine macroalgae from the Tamilnadu coast: distribution, diversity and biotechnological potential. *Botanica Marina*, *53*(5), 457-468. https://doi.org/10.1515/bot.2010.045

51- Verma, A., Malik, C.P., & Gupta, V.K. (2012). In vitro effects of brassinosteroids on the growth and antioxidant enzyme activities in groundnut. *International Scholarly Research Notices*, *1*, 1-8. https://doi.org/10.5402/2012/356485

52- Volkmann, H., Imianovsky, U., Oliveira, J.L., & Sant'Anna, E.S. (2008). Cultivation of Arthrospira (*Spirulina platensis*) in desalinator wastewater and salinated synthetic medium: protein content and amino-acid profile. *Brazilian Journal of Microbiology*, *39*(1), 98–101. https://doi.org/10.1590%2FS1517-83822008000100022
53- Xie, S.X., Lu, X.P., Ni, Q., & Zhao, X.L. (2012). *The effect of water stress on ABA, Jaand physiological characteristic of Citrus*. In XII International Citrus Congress, 125.
54- Yaish, M.W., Antony, I., & Glick, B.R. (2015). Isolation and characterization of endophytic plant growth-promoting bacteria from date palm tree (*Phoenix dactylifera* L.) and their potential role in salinity tolerance. *Antonie Van Leeuwenhoek*, *107*(6), 1519–1532. https://doi.org/10.1007/s10482-015-0445-zPMID:25860542
55- Yaish, M.W., & Kumar, P.P. (2015). Salt tolerance research in date palm tree (*Phoenix dactylifera* L.), past, present, and future perspectives. *Frontiers in Plant Science*, *6*, 348. https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00348
56- Zhang, Y.P., & Nan, Z.B. (2007). Growth and anti- oxidative systems changes in *Elymus dahuricus* is affected by *Neotyphodium* endophyte under contrasting water availability. *Journal of Agronomy and Crop Science*, *193*(6), 377–386. https://doi.org/10.1111/j.1439-037X.2007.00279.x